

Abschlussbericht Max-Buchner-Forschungsprojekt 3357

Entwicklung einer Reinigungsstrategie für rekombinante Proteine unter Verwendung eines selbstspaltenden Proteinlinkers

1. Aufgabenstellung

Biotechnologisch interessante Proteine werden zumeist als Fusionsproteine aus Zielprotein und einem Affinitätstag produziert. Die Verwendung eines Affinitätstags vereinfacht die Reinigung des Zielproteins aus einem Proteingemisch. Nach der Gewinnung des Fusionsproteins ist man zumeist bestrebt den Affinitätstag vom Zielprotein abzutrennen. In herkömmlichen Anwendungen wird der Affinitätstag durch den Zusatz einer Protease abgespalten. Dafür muss im Fusionsprotein eine Erkennungssequenz für eine spezifische Protease enthalten sein. Eine längere Inkubationszeit und ein zusätzlicher Reinigungsschritt zur Abtrennung des Affinitätstags und der Protease vom Zielprotein sind notwendig.

Im geförderten Projekt soll ein autokatalytischer Proteinlinker anstelle einer Erkennungssequenz für eine Protease für die gezielte Spaltung von Fusionsproteinen etabliert werden. Die Linkersequenz soll aus dem Protein VIC_001052 erstellt werden. Das Protein VIC_001052 ist in *Vibrio coralliilyticus* codiert [Kimes et al. 2012]. Es enthält eine konservierte Domäne (MIIA, metal ion-inducible autocleavage), die eine induzierbare Spaltaktivität besitzt. Die Domäne ist ca. 170 Aminosäuren lang. Die Aktivität ist durch verschiedene zweiwertige Metallionen induzierbar [Schirrmeister et al. 2013]. Es soll eine Methode für die Expression und Reinigung für rekombinante Proteine unter Verwendung der Linkersequenz erstellt werden. Die Domäne soll schrittweise auf die minimale Länge, die als Linker nutzbar ist, verkürzt werden. Ein Expressionsvektor mit der Linkersequenz soll für die Klonierung von Zielgenen erstellt werden. Anhand verschiedener Zielproteine soll die Reinigung und die Abspaltung durch Zusatz von Metallionen untersucht werden. Dabei soll die Effizienz mit herkömmlichen Reinigungsstrategien verglichen werden.

2. Ergebnisse

(I) Konstruktion des Expressionsplasmids

Zur Etablierung einer Reinigungsstrategie unter Verwendung des Proteinlinkers wurde ein Expressionsplasmid erzeugt (Abb. 1). Das Plasmid wurde von einem bekannten Expressionsvektor abgeleitet. Es besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen und das Repressorgen *lacI*. Der Expressionsvektor für *E. coli* wurde mit einer verkürzten MIIA-Domäne (Linker) und 3'-seitig mit einer Strep-tag codierenden Sequenz versehen. Zur Klonierung verschiedener Zielgene stehen mehrere Restriktionsschnittstellen (*XmaI*, *NheI*, *Acc65I*) zur Verfügung. Das Zielgen wird am 3'-Ende mit der Linker-codierenden Sequenz

verknüpft. Die Expression des Zielkonstruktes in *E. coli* erfolgt unter der Kontrolle des Ptac-Promotors und ist mit IPTG induzierbar.

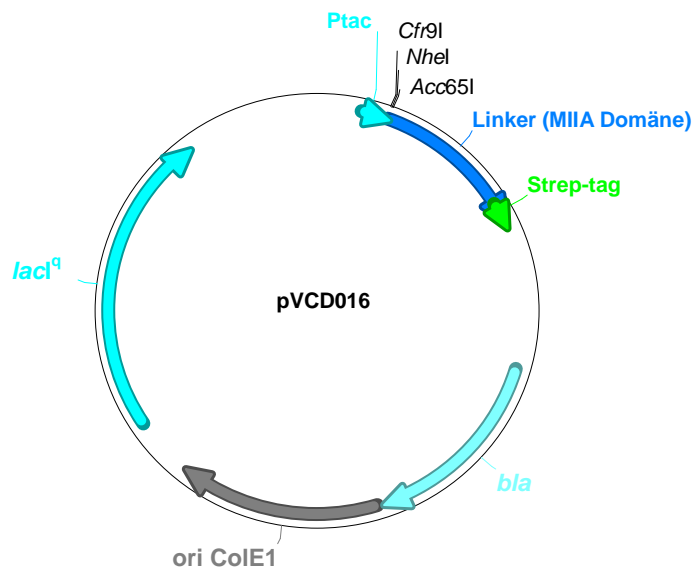


Abb. 1. Expressionsplasmid pVCD016 zur Klonierung verschiedener Zielgene als Fusionsprotein mit selbstspaltenden Proteinlinker und Strep-tag Sequenz.

(II) Verkürzung der MIIA-Domäne

Die annotierte Sequenz der MIIA-Domäne in der Datenbank umspannt 173 Aminosäuren. Davon liegen 44 Aminosäuren N-terminal zur Spaltstelle. Die Zielproteine für die Reinigung sollen mit dem N-Terminus der MIIA-Domäne verknüpft werden. Es wird angestrebt, dass eine möglichst geringe Zahl von Aminosäuren am Zielprotein nach der Spaltung verbleibt. Daraufhin wurden Experimente zur Verkürzung des Proteinlinkers auf der N-terminalen Seite durchgeführt. Es wurden schrittweise je 5 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt bis zu einer Deletion von 25 Aminosäuren und die Spaltaktivität der verkürzten MIIA-Domänen untersucht (Abb. 2).

Die Ergebnisse zeigen, dass 10 Aminosäuren ohne Aktivitätsverlust vom N-Terminus der MIIA-Domäne entfernt werden können. Eine Teilaktivität konnte auch für eine um 15 Aminosäuren verkürzte Domäne detektiert werden. Eine weitere Verkürzung der Domäne führte zum Verlust der Selbstspaltungsaktivität.

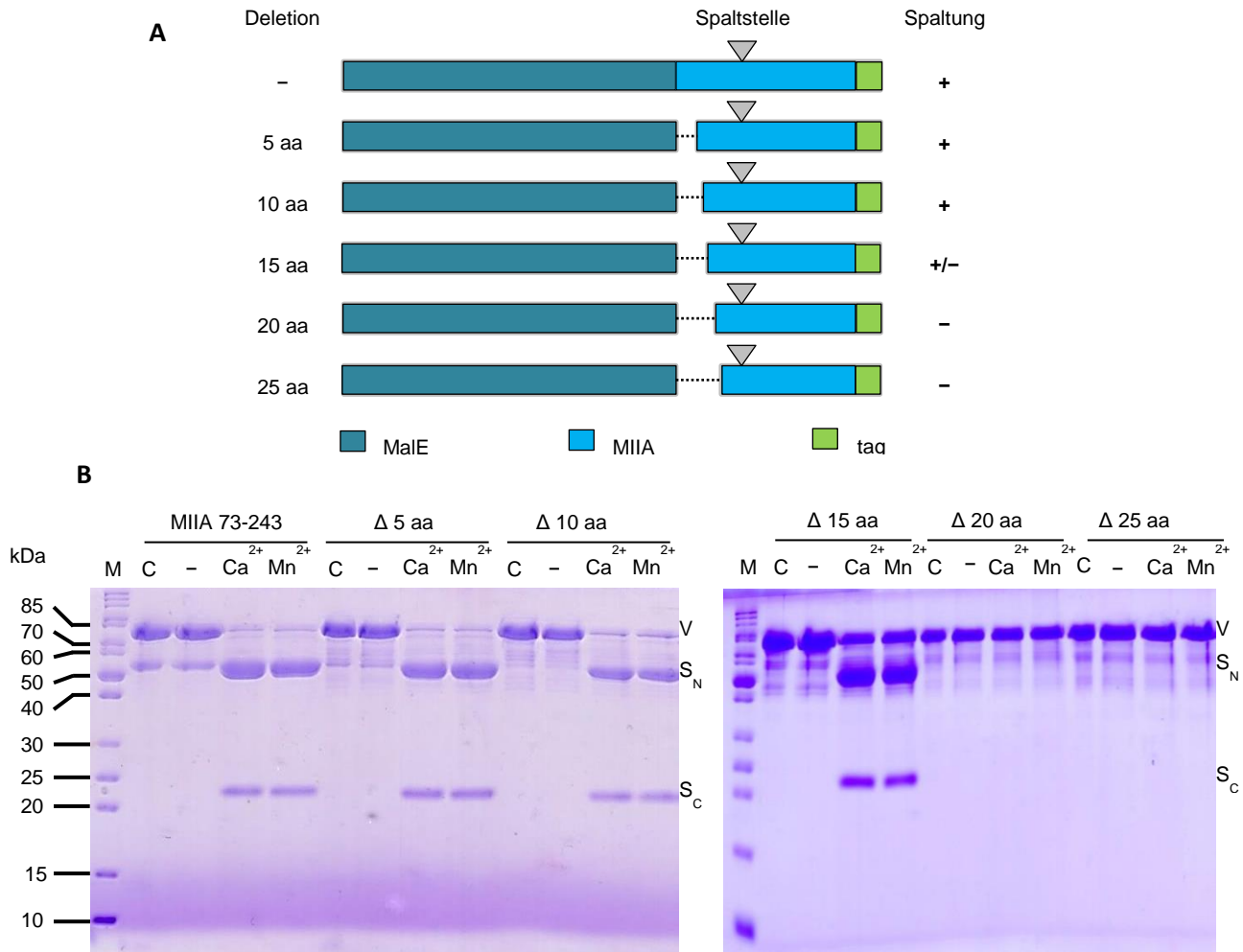


Abb. 2. Untersuchung der Spaltaktivität für verkürzte MIIA-Varianten. A) Schematische Darstellung der erzeugten Konstrukte mit N-terminal verkürzter MIIA-Domäne B) SDS-PAGE für die gereinigten Fusionsproteine mit vollständiger (MIIA 73-243) und verkürzten MIIA-Domänen $\Delta 5$ - $\Delta 25$ aa. Die Proteine wurden unbehandelt (C), nach Inkubation mit Puffer (-), mit Calciumionen (Ca^{2+}) und Manganionen (Mn^{2+}) aufgetragen. Das ungespaltene Protein (V) und die Spaltprodukte S_N und S_C sind markiert.

(III) Erzeugung und Reinigung von Fusionsproteinen als „proof of principle“

Es wurden die Zielgene (*malE* und *mcherry*) in den Expressionsvektor kloniert. Die Fusionsproteine wurden in *E. coli* als lösliche Proteine erzeugt und anschließend unter Einsatz des Strep-tags mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Spaltbarkeit dieser Fusionsproteine durch verschiedene Metallionen wurde untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine in Lösung mit Calcium und Mangan-(II)-Ionen nahezu vollständig gespalten werden konnten. Durch den Zusatz von Nickel- und Zink-Ionen wurde eine teilweise Spaltung beobachtet. Für den Einsatz des Linkers in der Proteinreinigung soll die Spaltung der Fusionsproteine an einer Reinigungsmatrix erfolgen. Im Folgenden wurden die Fusionsproteine an eine Strep-Tactin-Säule immobilisiert. Für die Spaltung wurden Calcium- und Mangan-(II)-Lösungen verwendet.

IV) Abspaltung des Affinitätstags auf der Reinigungsmatrix

In diesem Versuch wurde ein mcherry-MIIA-Strep-Fusionsprotein verwendet. Die Verwendung des fluoreszierenden Proteins mcherry als Zielprotein erlaubt die Quantifizierung der Reinigung und Spaltung, sowie den Vergleich mit dem herkömmlichen Reinigungsverlauf.

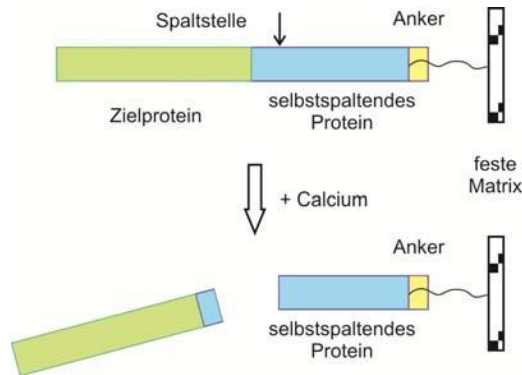


Abb. 3. Schema der Reinigung und Spaltung von immobilisierten Fusionsproteinen unter Verwendung des selbstspaltenden Proteinlinkers.

Der Gehalt an mcherry-MIIA-Strep-Fusionsprotein im Rohextrakt der induzierten Bakterienkultur wurde mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Der Rohextrakt wurde auf eine Strep-Tactin-Säule geladen. Die ungebundenen Proteine des Rohextraktes wurden durch Waschen der Reinigungsmatrix mit Puffer entfernt. Durch Zugabe von Calcium-Lösung wurde die Spaltung des Fusionsproteins auf der Säule induziert. Der C-Terminus der MIIA-Domäne verblieb zusammen mit dem Strep-tag an der Reinigungsmatrix verbunden. Nach der Elution von der Säule wurde die Ausbeute an Zielprotein mittels Fluoreszenzmessung ermittelt (Abb. 4).

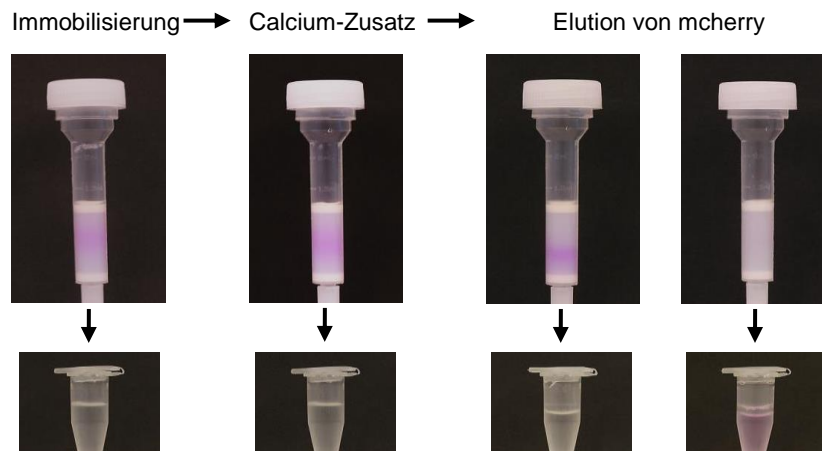


Abb. 4. Reinigung des Zielproteins mcherry aus dem Rohextrakt einer mcherry-MIIA-Strep-produzierenden Kultur.

Zum Vergleich der Effizienz der Reinigung und Spaltung wurde das Protein durch drei verschiedene Methoden von der Reinigungsmatrix eluiert und anschließend die Ausbeute quantifiziert (Abb. 5).

- A) Durch Zugabe von Desthiobiotin wurde die Bindung des Strep-tags an die Säule aufgehoben und das ungespaltene Fusionsprotein mcherry-MIIA-Strep eluiert.
- B) Durch Zugabe von Calcium-Ionen wurde das Zielprotein mcherry von der MIIA-Domäne abgespalten und von der Säule eluiert. Der C-Terminus der MIIA-Domäne bleibt zusammen mit dem Affinitätstag an der Säule gebunden.
- C) Durch Zugabe von Mangan-(II)-Ionen wurde das Zielprotein mcherry von der MIIA-Domäne abgespalten und von der Säule eluiert. Der C-Terminus der MIIA-Domäne bleibt zusammen mit dem Affinitätstag an der Säule gebunden.

Die Fluoreszenz des Eluats wurde bestimmt und die Ausbeute bezüglich der Fluoreszenz des Rohextraktes berechnet. Für die Elution mit Desthiobiotin wurde eine Ausbeute von 68 % für das ungespaltene Fusionsprotein erzielt. Durch die autokatalytische Spaltung des Linkers mit Calcium konnte eine Ausbeute von 60% des abgespaltenen Zielproteins mcherry erzielt werden. Durch den Zusatz von Mn-(II)-Ionen wurden 59 % des mcherry Protein erhalten.

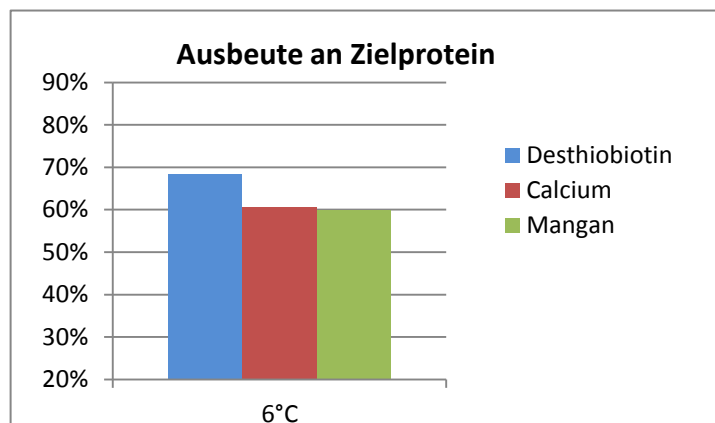


Abb. 5. Vergleich der Reinigungseffizienz für das Zielprotein mcherry nach der Elution von einer Reinigungsmatrix (hier Strep-Tactin) unter Verwendung von verschiedenen Metallionenlösungen bzw. Desthiobiotin-haltigem Elutionspuffer.

3. Zusammenfassung und Nutzen für die Biotechnologie

Mit diesen Arbeiten konnte eine Reinigungsstrategie für rekombinante Fusionsproteine entwickelt werden, die ohne den Einsatz herkömmlicher Proteasen auskommt. Für die Abspaltung des Fusionspartners wird die Aktivität eines autokatalytischen Proteinlinkers genutzt. Die Sequenz des Linkers wurde schrittweise verkürzt. Nach derzeitigen Kenntnissen können 10 -15 Aminosäuren vom N-Terminus des Linkers abgetrennt werden, bei gleichzeitigem Erhalt der Spaltaktivität. Nach der Spaltung verbleiben 29 Aminosäuren des Linkers am C-Terminus des Zielproteins. Die autokatalytische Spaltung konnte auch bei immobilisierten Fusionsproteinen durch verschiedene Metallionen induziert werden. Die Effizienz der Reinigung liegt bei ca. 60 % an Zielprotein. Diese Ausbeute liegt nur geringfügig unter

der Effizienz der Reinigung ohne Abspaltung des Fusionspartners (68%). Im Vergleich mit herkömmlichen Reinigungsstrategien unter Verwendung von Proteasen, besitzt diese Methode mehrere deutliche Vorteile. Die Spaltung des Linkers ist sehr spezifisch. Es wurden keine zusätzlichen unerwünschten Spaltprodukte für die getesteten Fusionsproteine beobachtet. Die Reaktion verläuft außerordentlich schnell; nach 30 min Inkubation bei 6°C ist die vollständige Spaltung erreicht. Im Anschluss ist kein weiterer Reinigungsschritt zur Abtrennung einer Protease notwendig. Die Aktivität des Linkers ist äußerst stabil in einem breiten pH- und Temperaturbereich. Diese Reinigungsstrategie für rekombinante Proteine ist gegenüber herkömmlichen Ansätzen zeitsparender, einfacher in der Handhabung und mit deutlich niedrigeren Kosten verbunden.

Literatur:

Kimes NE, Grim CJ, Johnson WR, et al. (2012) Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. ISME J 6: 835-846.

Schirrmeister J, Zocher S, Flor L, Göttfert M & Zehner S (2013) The domain of unknown function DUF1521 exhibits metal ion-inducible autocleavage activity - a novel example from a putative effector protein of *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450. FEMS Microbiol Lett 343: 177-182.